

omaggio dell'Ar -

DOTT. SAMUELE SERENI

B5 174

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DEL SANGUE DEI MALARICI

Nuovo metodo tecnico per la ricerca dei parassiti

~~Tecnica~~

Estratto dal POLICLINICO, Vol. XIV-M., 1907

ROMA

AMMINISTRAZIONE DEL GIORNALE "IL POLICLINICO",
N. 219 - Corso Umberto I - N. 219

1907

DOTT. SAMUELE SERENI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DEL SANGUE DEI MALARICI

Nuovo metodo tecnico per la ricerca dei parassiti

Estratto dal POLICLINICO, Vol. XIV-M., 1907

ROMA

AMMINISTRAZIONE DEL GIORNALE "IL POLICLINICO",
N. 219 - Corso Umberto I - N. 219

1907

Proprietà letteraria

LABORATORIO DI ISTOLOGIA E FISIOLOGIA GENERALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
diretto dal prof. G. MAGINI

Contributo allo studio del sangue dei malarici:

nuovo metodo tecnico per la ricerca dei parassiti.

Dott. SAMUELE SERENI, assistente e libero docente.

I numerosi studi eseguiti sul sangue nella infezione malarica, hanno dimostrato che i globuli rossi parassitiferi subiscono modificazioni morfologiche diverse, le quali sono state accuratamente notate e descritte da vari autori. Al contrario ben poco sappiamo sulle alterazioni che si verificano nelle proprietà fisiche degli eritrociti quando sono invasi dai parassiti della malaria e le nostre cognizioni in proposito si limitano a quelle che sono state fatte rilevare dal Bignami: gli autori successivi, non hanno fatto altro che riferire ciò che era stato osservato dal patologo romano.

Il Bignami « studiando la distribuzione dei parassiti nei vasi dei vari visceri nelle perniciose, notò che le emazie parassitifere tendono a disporsi, nelle vene di un certo calibro, alla periferia del vaso addossandosi alle pareti e che qualche volta i globuli parassitiferi si raccolgono in grande quantità in uno stesso vaso rimanendo tutti accollati come se fossero agglutinati; e cercò di spiegare questi fatti ammettendo una diminuita elasticità del discoplasma ed una alterazione delle qualità della superficie, la quale pare diventi come vischiosa. In conseguenza di ciò le emazie con parassiti, specialmente adulti, sono meno adatte alla circolazione delle emazie normali: la qual cosa va detta per le febbri estivo-autunnali.

Della giustezza di tali induzioni si può avere la prova anche con la osservazione diretta: infatti se in un comune preparato a fresco di sangue estivo-autunnale, in cui siano numerosi i globuli contenenti corpi con blocchetto di pigmento, si determinano con la pressione delle correnti di globuli, si vede che quelli contenenti i corpi suddetti si lasciano trasportare poco o punto e pare che tendano ad ade-

rire al vetrino: si può dunque con ragione pensare che anche molti globuli, i quali del resto non mostrano, salvo la presenza di parassiti, alcuna riconoscibile alterazione microscopica, siano meno elastici del normale e alquanto viscosi. Alterazioni simili delle proprietà fisiche si possono mettere in evidenza anche nei globuli rossi contenenti parassiti terzanari e quartanari, sebbene in questo caso siano meno notevoli che non nelle febbri gravi: facendo penetrare ad esempio sotto il vetrino coprioggetti una soluzione fisiologica di cloruro di sodio, durante l'osservazione microscopica, si può osservare che i globuli non parassitiferi si spostano più facilmente dei parassitiferi, i quali aderiscono leggermente al vetrino e si muovono oscillando intorno al punto di adesione senza allontanarsene se la penetrazione della soluzione cloruro-sodica si fa con una certa lentezza » (1).

Come ho già accennato, oltre queste che ho ora riferite, nessun'altra nozione abbiamo riguardo alle alterazioni fisiche delle emazie contenenti gli ematozoi della malaria, e mi è sembrato quindi opportuno e meritevole di essere seguito, il consiglio datomi dal Bignami stesso di eseguire qualche altra ricerca in proposito.

Già *a priori* è logico ed ovvio il pensare che la presenza dei parassiti della malaria nell'interno dei globuli rossi del sangue, o anche la semplice adesione di quelli alle emazie, come vogliono alcuni, debba far variare il peso specifico di tali eritrociti: ma nessuno finora ha accennato a questo fatto e tanto meno sono state praticate delle ricerche per decidere se essi diventano più o meno pesanti degli altri globuli rossi.

Io ho voluto vedere appunto in qual modo si modificasse il peso specifico delle emazie parassitifere in rapporto a quello delle normali e per eseguire tale studio mi sono valso di ambedue i mezzi di ricerca che potevano condurmi allo scopo desiderato e cioè tanto del metodo della centrifugazione, quanto di quello della sedimentazione meccanica e spontanea.

Il primo, più semplice e più rapido, consiste nel prelevare il sangue per mezzo di un tubetto capillare e sottoporlo immediatamente, prima cioè che abbia luogo la coagulazione completa del sangue stesso, ad una rapida centrifugazione. L'altro, profittando della proprietà che hanno alcune sostanze speciali di ritardare o ostacolare la coagulazione del sangue estratto dal torrente circolatorio, consiste nel mescolare il sangue con una di queste sostanze o con una miscela anticoagulante, e lasciare poi sedimentare lentamente le parti figurate in un recipiente adatto, ovvero affrettare la sedimentazione per mezzo della centrifugazione.

Come è noto, tutti e due questi metodi sono stati già utilizzati sia dai fisiologi che dai clinici, tanto per poter analizzare separatamente gli elementi morfologici del sangue e determinarne le quantità proporzionali, quanto per poter ricercare quale è l'influenza che le diverse malattie esercitano sul volume del sedimento. Io invece me ne sono servito per uno scopo assolutamente diverso, quale è quello già da me indicato, di ricercare cioè fra gli elementi cellulari che si riscontrano nel sangue dei malarici, quali sono quelli più pesanti e quali più leggeri. E' naturale che i corpuscoli bianchi e rossi di un peso specifico maggiore dovranno guadagnare

la parte più eccentrica del tubetto di vetro dell'ematocrito, nel caso della centrifugazione, e la parte più bassa del recipiente, nel caso della sedimentazione spontanea, e che, viceversa, quelli di un peso specifico minore, dovranno portarsi, corrispondentemente, nella parte centripeta o in quella più alta del sedimento ottenuto nelle due maniere anzidette.

Come ho già detto, una ricerca di tal genere, per quanto mi risulta dalle accuratissime indagini eseguite in proposito, non è stata mai praticata sul sangue dei malarici. Soltanto il Celli (2) riferisce di aver centrifugato il sangue appena estratto dagli individui febbricitanti per malaria, ma per ricercare se nei globuli sanguigni si annidasse una tossina malarica pirogena; a tale scopo disseccò i globuli raccolti nel fondo dei tubi della centrifuga, li polverizzò, li disciolse in una soluzione fisiologica di cloruro di sodio e li inoculò.

Le modalità di applicazione dei due metodi fondamentali della centrifugazione e della sedimentazione spontanea del sangue sono molto numerose, ma tutte le diverse modificazioni sono state suggerite dalla necessità di avere, per un'uguale quantità di uno stesso sangue, un sedimento di un volume costante: e ciò perchè questo mezzo d'indagine potesse avere, nelle ricerche fisiologiche e cliniche, un vero valore scientifico e pratico. Ma, nel mio caso, una tale necessità non esisteva e perciò ho potuto fare a meno di preoccuparmene.

In principio mi servii della semplice e rapida centrifugazione del sangue, tale quale veniva estratto dal torrente circolatorio dei malarici. A tal uopo usavo dei tubetti di vetro, di vario calibro, alcuni capillari, altri del diametro di $\frac{1}{2}$ -1-2 mm. e più e di una lunghezza tale da poter essere facilmente e con rapidità afferrati fra le branche dell'ematocrito (circa $6\frac{1}{2}$ cm. di lunghezza). Questi tubetti venivano lavati precedentemente, prima con una soluzione concentrata di potassa caustica, poi con acqua distillata, quindi con alcool e di nuovo con acqua distillata ed infine con etere solforico, che lasciavo completamente evaporare prima di adoperare i tubetti.

E' ben nota l'osservazione di Freund, secondo la quale il sangue, raccolto alla uscita dei vasi, in un recipiente le cui pareti sono lubrificate internamente con olio o con vasellina, non si coagula che con una estrema lentezza, e siccome, per la natura delle mie ricerche, sarebbe stato molto opportuno ed utile poter raggiungere questo intento, ho cercato anch'io di usufruire di questa cognizione. Perciò, in alcuni casi, tenni immersi per qualche tempo i tubetti (prima di adoprarli per la prelevazione del sangue), in olio d'ulive; ma ben presto dovetti abbandonare questo artificio tecnico, perchè le finissime goccioline di olio che rimanevano adese alla superficie interna del tubetto e che si distaccavano poi dal vetro, sotto l'azione della forza centrifuga, rendevano poi più difficile e dubbia l'interpretazione dei preparati microscopici allestiti col sedimento del sangue centrifugato. Così pure, e sempre per cercare di ritardare la coagulazione del sangue, ho tentato di ricorrere al metodo consigliato a tale scopo da Bordet e Gengou (3), rivestendo le pareti interne dei tubetti con uno strato di paraffina solida: ma dovetti rinunciare anche a questo

mezzo, perchè difficilmente il sangue riempiva per capillarità dei tubetti così preparati.

Dopo aver lavato accuratamente prima con alcool, poi con una soluzione acquosa al millesimo di sublimato corrosivo ed infine con etere solforico il polpastrello di un dito del malato, praticavo una piccola incisione per mezzo di una lancetta sterilizzata. Il sangue sgorgava così con facilità e senza che, in generale, fosse necessaria una forte pressione sui tessuti circostanti alla ferita. Bastava allora avvicinare alla goccia di sangue una delle estremità di un tubetto, tenuto in posizione orizzontale, perchè il sangue vi penetrasse per capillarità e lo riempisse subito. Chiudevo poi una o tutte e due le estremità del tubetto, facendone fondere il vetro per mezzo della fiamma di una lampada a gas o a spirito, o meglio tappandone le aperture con un po' di ceralacca fusa. Infine innestavo il tubetto fra le branche dell'ematocrito, centrifugavo e, in un minuto o poco più ottenevo la separazione della parte corpuscolata del sangue dal siero.

Tutte queste manualità, in realtà molto più lunghe a descriverle che a metterle in esecuzione, erano compiute con la massima rapidità possibile affinchè nel frattempo il sangue non si coagulasse. Ma si comprende facilmente che, quantunque si ponesse grande cura nel tener pronto tutto quello che era necessario, pure trascorrevva sempre un certo intervallo fra la prelevazione del sangue e la centrifugazione di esso. Cosicchè poteva sorgere il dubbio che, in questo lasso di tempo, alcuni elementi cellulari, di diverso peso specifico, potessero rimanere impigliati fra le maglie del reticolo di fibrina del coagulo che andava formandosi nel sangue estratto dal torrente circolatorio e che, per conseguenza, non potessero poi liberamente raggiungere quelle parti nelle quali avrebbero dovuto trovarsi, per effetto della centrifugazione, dato il loro differente peso specifico. Ai risultati così ottenuti si poteva quindi fare l'obbiezione di non essere rigorosamente esatti, ed è perciò che, nelle mie ricerche successive, pur continuando a servirmi del metodo che ho ora indicato e che già mi aveva dato dei buoni risultati, credetti necessario di ricorrere anche ad un altro, nel quale i suddetti inconvenienti potessero essere del tutto evitati.

Per ottenere ciò, bastava ostacolare o ritardare la coagulazione del sangue, e questo si verifica quando si ricorre al metodo, che già è conosciuto in fisiologia ed in clinica, col nome di sedimentazione sanguigna e che, alla sua volta, comprende due procedimenti. Uno meccanico, nel quale il sangue, mescolato con una sostanza anticoagulante, viene sottoposto all'azione della forza centrifuga; l'altro spontaneo, nel quale, dalla miscela del sangue con la sostanza anticoagulante, si lascia che i globuli sanguigni si depositino lentamente, in un recipiente adatto, sotto l'influenza del loro proprio peso.

I mezzi consigliati per impedire o per ritardare la coagulazione del sangue, sono numerosi, di natura diversa, ed esplicano la loro azione in seguito a meccanismi differenti. Ma non tutti questi mezzi erano utilizzabili nel caso mio, perchè mi occorreva che i globuli rossi non fossero nè deformati, nè resi friabili, nè alte-

rati in alcun altro modo. A questi requisiti corrispondono abbastanza bene, sia il reattivo suggerito da Daland (4) (soluzione acquosa di bicromato di potassa al 2 1/2 %), che la miscela proposta dal Marcano (5), la quale, alle proprietà fissatrici e anticoagulanti, date dalla presenza del solfato di soda e del formolo, unisce il vantaggio di contenere una quantità tale di cloruro di sodio, da costituire, nel suo insieme, una soluzione isotonica per il sangue: la sua formula è la seguente:

soluzione acquosa di solfato di soda della densità = 1020 ..	centmc.	100
cloruro di sodio.....	gm.	1
formolo 40 %	centmc.	3

I globuli rossi vi si conservano intatti per un tempo illimitato e senza subire la minima deformazione.

Anche in questo caso, non essendo necessario per il mio scopo, da un lato di determinare con precisione la quantità di sangue da esaminare e quella di liquido anticoagulante da aggiungere, e dall'altro di ottenere un sedimento di volume costante, ho potuto fare a meno di tener conto di tutte le cautele raccomandate dai vari autori che si sono serviti del metodo della sedimentazione sanguigna per gli scopi fisiologici e clinici già ricordati e di adoprare gli apparecchi da essi consigliati, ed ecco come ho proceduto.

In alcuni casi deponevo una goccia della soluzione di bicromato di potassa o della miscela di Marcano sul polpastrello del dito del malato, in vicinanza dell'incisione praticata con la lancetta e, con una leggiera pressione sul dito stesso, facevo pervenire a contatto di essa una goccia di sangue. Lambendo poi questo miscuglio, formato dal reattivo anticoagulante e dal sangue, con uno dei soliti tubetti, questo si riempiva per capillarità: chiudevo poi le estremità del tubetto, lo innestavo fra le branche dell'ematocrito e centrifugavo per uno o due minuti.

In altri casi invece mi sono servito di comuni pipette di vetro, con la parte assottigliata molto lunga e capaci di contenere alcuni centimetri cubi di liquido e che, già in precedenza, avevo pulito accuratamente, servendomi della stessa tecnica che ho già descritta a proposito dei tubetti che mi servivano per la centrifugazione.

Con queste pipette aspiravo o direttamente, o per mezzo di un tubo di gomma simile a quello annesso alle pipette del contaglobuli di Thoma-Zeiss, prima una certa quantità della miscela di Daland o di Marcano, sufficiente per riempire la parte assottigliata delle pipette, poi qualche goccia di sangue sgorgante dalla ferita del dito del malato e poi di nuovo una quantità indefinita e variabile di liquido anticoagulante: infine chiudevo la punta della pipetta con un po' di cerallacca. Ottenevo così un miscuglio dal quale, lasciando la pipetta in riposo in posizione verticale e con la parte assottigliata diretta verso il basso, cominciavano ben presto a depositarsi i globuli sanguigni in forma di poltiglia molle: in generale la sedimentazione era completa dopo 15-18 ore.

Dopo aver provveduto così, con i diversi metodi che ho indicato alla raccolta del materiale di studio, era necessario determinare in quale parte del sedimento

sanguigno si trovassero i globuli parassitiferi ed in quale i normali. Per eseguire tale ricerca procedevo nel seguente modo.

Nel caso della semplice centrifugazione del sangue, bastava rompere le estremità chiuse del tubetto, servendosi delle forbici o di un altro mezzo qualunque, e di raccogliere poi successivamente, cominciando dalla parte più eccentrica del sedimento sanguigno, le gocce fornite da questo, sopra dei vetrini portaoggetti ben puliti. Ricoprendo poi, con la solita tecnica, queste goccioline con dei vetrini coprioggetti, ottenevo una serie di preparati microscopici a fresco che, esaminati e confrontati fra loro, per mezzo di un microscopio con obbiettivo ad immersione omogenea, mi permettevano di stabilire con esattezza in quali fossero più numerosi i globuli parassitiferi ed in quali meno.

Naturalmente i primi preparati così ottenuti erano quelli che contenevano gli elementi cellulari più pesanti del sangue del malato, perchè erano quelli che, per effetto della forza centrifuga, erano pervenuti nella parte del sedimento sanguigno più lontana dall'asse di rotazione, mentre i preparati successivi erano costituiti da elementi cellulari di peso specifico minore, perchè allestiti con materiale prelevato dagli strati del sedimento globulare più prossimi alla zona del tubetto occupata dal siero. Per facilitare l'uscita delle singole goccioline del sedimento, bastava o soffiare delicatamente dentro il tubetto dalla estremità opposta a quella nella quale era raccolta la parte corpuscolata del sangue, ovvero scuotere sopra il vetrino portaoggetti, con movimenti bruschi dall'alto al basso, il tubetto stesso, tenuto in posizione verticale e con l'estremità eccentrica rivolta inferiormente.

In alcuni casi, per controllare i risultati avuti con questo metodo, ho modificato il procedimento di ricerca in maniera che i primi preparati microscopici ottenuti fossero quelli forniti dalla parte centripeta del sedimento globulare. A tale scopo, dopo aver intaccato, con una piccola lima, il vetro del tubetto in corrispondenza della zona che segnava il limite fra il sedimento ed il siero, era facile spezzare il tubetto precisamente in quel determinato punto ed era possibile quindi cominciare l'esame delle parti corpuscolate sedimentate da quello strato che confinava col siero.

Qualche volta ho raccolto le goccioline sopra vetrini coprioggetti, e con la solita tecnica, ho allestito dei preparati per strisciamento che, colorati con i vari metodi proposti per metter meglio in evidenza i parassiti della malaria, mi hanno fornito delle preparazioni permanenti molto utili per gli esami di controllo e di comparazione.

Perchè queste mie ricerche riuscissero, quanto più era possibile, complete e dimostrative, avrei desiderato poter confrontare i risultati ottenuti con i modi che ho indicati con quelli forniti dalle sezioni, eseguite col microtomo, sul sedimento, opportunamente fissato ed incluso, ottenuto dalla centrifugazione del sangue dei malarici. Ma, per fare queste ultime ricerche, ho incontrato molte e diverse gravi difficoltà tecniche che solo in parte ed in alcuni casi sono riuscito a vincere.

Innanzitutto riesce molto difficile estrarre dal tubetto di vetro la parte sedimentata del sangue ed immergerla poi in un liquido fissatore, in maniera tale, che

non solo rimanga integra nella sua forma, ma che i rapporti fra le sue diverse parti rimangano inalterati e che non si trasportino dei globuli parassitiferi in zone dove prima non esistevano e viceversa. Cercai di rimediare a questi inconvenienti adottando, per la centrifugazione del sangue, invece dei soliti tubetti di vetro, degli altri fatti con materiale diverso e adatto o ad essere tagliato facilmente in direzione parallela all'asse del tubetto, o ad essere rammollito ed asportato senza che fosse necessario toccare in alcun modo il sedimento sanguigno; avrei potuto così fissare questo *in situ* e per conseguenza conservare i veri rapporti delle sue varie parti costituenti. A tal uopo mi sono servito di tubetti fatti di pasta alimentare o di pagliuzze verniciate o no, ecc., ma nessuno di questi mezzi nè altri da me sperimentati, mi diedero dei risultati soddisfacenti. Soltanto in pochi casi e dopo numerosi e pazienti tentativi, mi riuscì possibile di avere dei sedimenti sanguigni in condizioni tali da poter essere utilizzati per lo scopo da me desiderato, lubrificando, prima di raccogliervi il sangue, la superficie interna dei tubetti di vetro con olio di legno di cedro e adottando dei tubetti di calibro molto grande.

Fissai questi sedimenti o con soluzioni di sublimato corrosivo o con liquido di Müller o di Tellyesniczki o con alcool ordinario: ma poi, per la loro inclusione, dovetti lottare contro altre difficoltà: il metodo comunemente usato, rendeva i pezzi friabilissimi, cosicchè non era possibile ricavarne delle buone sezioni microtomiche. Finalmente, dopo varî tentativi, riuscii ad ottenere delle sezioni intere ed abbastanza sottili, ricorrendo all'elegante metodo immaginato da Giesbrecht che, al vantaggio di conservare le più delicate strutture cellulari, unisce quello di non rendere i tessuti friabili anche dopo un soggiorno prolungato nell'olio di cedro. Perciò, dopo aver rapidamente disidratato il sedimento con la tecnica abituale, lo trasportavo con cautela, per evitare che si rompesse, in un tubetto contenente dell'olio di legno di cedro e dell'alcool assoluto. Come è noto, questi due liquidi non si mescolano e l'alcool galleggia sull'olio: il sedimento rimaneva da principio immerso nell'alcool e nuotava sulla superficie di separazione dei due liquidi, ma poi lentamente guadagnava il fondo del recipiente e quando il pezzo da includere era rimasto immerso per qualche tempo nell'essenza di legno di cedro, dopo aver tolto aspirandolo con una pipetta l'alcool assoluto soprastante, lo trasportavo nella paraffina. Fatta l'inclusione ed eseguite le sezioni, queste venivano colorate con ematossilina acida di Ehrlich e con eosina in soluzione acquosa.

Anche quando mescolavo il sangue con un liquido anticoagulante, le parti figurate di quello si raccoglievano, come ho già detto, nella parte affilata della pipetta, nel caso della sedimentazione spontanea, e nella parte eccentrica del tubetto, in quello della centrifugazione: perciò, anche in questi casi, il metodo di esame dei varî strati del sedimento era presso a poco uguale a quello da me indicato precedentemente. Soltanto, siccome il sedimento era in forma di una poltiglia densa, per allestire i preparati microscopici da esaminare comparativamente, era necessario raccogliere con un ago un pò della massa corpuscolare e diluirla con una

goccia o del liquido anticoagulante stesso o di una soluzione isotonica di cloruro di sodio. L'uso delle semplici pipette, con la parte assottigliata molto lunga, mi ha fornito la possibilità di determinare con grande precisione quale è la posizione esatta che assumono i diversi elementi cellulari del sangue, parassitiferi o no, quando viene loro permesso di obbedire liberamente alla sola influenza del loro diverso peso specifico, perchè il sedimento andando ad occupare la parte sottile della pipetta viene distribuito in una lunga colonna.

Servendomi di questi diversi mezzi tecnici di indagine ho eseguito un numero grandissimo di ricerche sul sangue dei malarici: ma, siccome sarebbe troppo lungo ed inutile descrivere dettagliatamente i singoli reperti che ho ottenuto nei diversi casi da me presi in esame, mi limiterò, per brevità, a riassumere i risultati ai quali sono pervenuto.

Tuttavia, prima di fare ciò, desidero far notare che, nel compiere questo studio, contemporaneamente alla prelevazione del sangue che doveva servire alle mie ricerche, ho eseguito sempre anche l'esame microscopico immediato, a fresco, del sangue dello stesso malato. In questo modo io potevo determinare nelle singole esperienze, sia il numero dei parassiti riscontrabili con il metodo di ricerca che per solito viene adoperato in clinica e nella pratica ospitaliera, sia lo stadio di sviluppo degli ematozoi esistenti nel sangue del malarico in quel dato momento. Così potevo stabilire anche se si trattava di un'infezione estivo-autunnale o primaverile o mista, ovvero se si riscontravano nel sangue forme appartenenti a una sola o a due o a più generazioni di parassiti (terzana semplice o doppia; quartana semplice, doppia, tripla). D'altra parte per mezzo dell'anamnesi e dell'esame obbiettivo dell'infermo, cercavo di ricavare altri dati che mi permettevano di rilevare se si trattava di una infezione malarica primitiva o recidiva, se l'individuo era in buone condizioni generali di salute ovvero se era deperito e cachettico, se era affetto da altre malattie, se era febbricitante o apiretico, se l'infezione malarica era recente o datava da lungo tempo, ecc. Inoltre ho tenuto conto anche del sesso dell'ammalato, della stagione nella quale ho eseguito l'esperienza, ecc., e aggiungerò ancora che ho avuto cura di controllare ripetutamente i risultati ottenuti nei diversi casi, con quelli avuti in altri simili.

Ma non ho trovato che queste diverse modalità da me prese in considerazione esercitino una influenza qualunque sulla qualità dei reperti, cioè che questi siano modificati in qualche modo per effetto delle suddette condizioni.

Infatti, in tutti i casi, i globuli rossi contenenti parassiti, si riscontrano sempre, con grandissima prevalenza, nelle zone più eccentriche o in quelle più basse del sedimento sanguigno e ciò sia che si tratti di infezione malarica primaverile (terzanaria o quartanaria), che estivo-autunnale, e tanto nel caso che i parassiti siano giovani, quanto in quello che essi siano adulti e pigmentati e sporulanti. Al contrario, negli strati del sedimento sanguigno più alti o in quelli più vicini all'asse di rotazione, le emazie parassitifere sono rarissime o mancano affatto.

Fanno eccezione a questa regola soltanto le semilune, le quali invece si trovano

in massima parte raggruppate nella zona di confine fra il sedimento globulare ed il siero del sangue e precisamente nello strato occupato dai corpuscoli bianchi, miste a questi. In questa stessa zona si riscontrano pure, in generale, i leucociti pigmentiferi, ma è difficile poter stabilire con precisione, data la piccola altezza della colonna costituita dai globuli bianchi, se quelli contenenti melanina occupino uno strato piuttosto che un altro della colonna stessa; tuttavia credo di poter affermare, con grande probabilità di essere nel vero, che i leucociti carichi di pigmento melanico sono più pesanti degli altri, perchè per lo più essi sono più abbondanti in quello strato della suddetta colonna che confina col sedimento dei globuli rossi.

Nell'eseguire quelle ricerche di controllo, alle quali ho già accennato nel descrivere la tecnica da me seguita, cominciando cioè l'esame del sedimento sanguigno dagli strati di questo confinanti col siero, mi è occorso alcune volte di constatare che, nei primi preparati così allestiti, si riscontrava una notevole quantità di emazie contenenti parassiti: per conseguenza tali reperti sarebbero stati in contraddizione con i risultati che or ora ho riferiti. Ma ricerche più accurate mi hanno permesso di stabilire che tale fatto si verificava soltanto quando praticavo l'esame del sedimento globulare alcuni giorni dopo che il sangue era stato prelevato dal malato. In tale caso il sedimento sanguigno si retrae alquanto e fra esso e le pareti del tubetto si raccoglie una piccola quantità di siero: in siffatte condizioni, rompendo il tubetto in corrispondenza della zona di confine fra la parte liquida e quella corpuscolata del sangue, i primi preparati microscopici che si allestiscono, non contengono i globuli sanguigni dello strato di sedimento più vicino all'asse di rotazione, ma bensì il siero raccolto fra le pareti del tubetto ed il sedimento stesso: ora questo siero, molto facilmente trascina con sé dei globuli rossi parassitiferi appartenenti agli strati più eccentrici del sedimento e perciò si spiegano questi reperti che, solo in apparenza, contraddicono la regola generale dedotta dai risultati costanti e concordi da me ottenuti in tutti gli altri casi.

Tanto dopo la centrifugazione semplice del sangue, quanto dopo la sua sedimentazione, spontanea o meccanica, i corpuscoli bianchi e rossi, parassitiferi o no, si conservano benissimo nella loro completa integrità e non presentano nè modificazione di colore, nè raggrinzamento, nè frammentazione, nè disfacimento granulare, nè alcun'altra alterazione apparente. Cosicchè i preparati microscopici allestiti con il materiale prelevato della varie zone del sedimento sanguigno, non differiscono in modo apprezzabile, da quelli eseguiti direttamente col sangue estratto là per là dal torrente circolatorio. Anche i parassiti malarici conservano la forma e gli altri loro caratteri normali e non abbandonano i globuli rossi se non parecchie ore dopo che il sangue è stato raccolto: così pure la colorabilità sia delle emazie e dei leucociti che degli ematozoi rimane inalterata.

I risultati che io ho ottenuti sono stati sempre concordi tanto col metodo della centrifugazione quanto con quello della sedimentazione sia spontanea che meccanica. Soltanto, come era facile prevedere, i reperti sono stati molto più dimostrativi col secondo metodo; ma, d'altra parte, debbo far notare che l'aggiunta di so-

stanze anticoagulanti, o per lo meno di quelle da me usate, al sangue dei malarici, ha l'inconveniente di rendere più rapido l'abbandono del parassita dal globulo rosso, in modo che è necessario eseguire prontamente l'esame del sedimento per poter determinare in quale zona di esso si raccolgano le emazie parassitifere.

Da queste mie esperienze risulta dunque che la presenza nell'interno dei globuli rossi dei parassiti malarici, siano essi giovani o adulti o sporulanti, pigmentati o no, estivo-autunnali o primaverili, modifica il peso specifico delle emazie aumentandolo e che, al contrario, la presenza delle forme semilunari lo modifica in senso inverso, cioè diminuendolo. Ora a me sembra che questa constatazione che, per sè, avrebbe soltanto una importanza puramente scientifica, possa invece avere anche un'utile applicazione pratica e clinica e che si presti ad alcune considerazioni.

Io credo infatti che la semplice e rapida centrifugazione del sangue dei malarici, possa costituire, in parecchi casi, un nuovo ed utile metodo tecnico di indagine per la ricerca degli ematozoi: d'altra parte esso è un procedimento non molto molesto per il paziente, abbastanza semplice e di facile esecuzione e non richiede, per ogni esame, che una quantità di sangue relativamente scarsa. E credo pure che tale metodo potrà essere applicato con vantaggio anche nella ricerca di altri parassiti del sangue sia dell'uomo che di altri animali e che potrà riuscire utile anche per studiare meglio e più facilmente il modo di comportarsi dei globuli bianchi nelle diverse malattie e a stabilire quale ne è il numero percentuale e proporzionale delle varie specie.

Non voglio dire con questo che, il metodo della centrifugazione del sangue, debba essere il procedimento abituale da preferire per la ricerca dei parassiti della malaria nel sangue circolante, ma io credo che in parecchi casi esso potrà essere adoperato con indiscutibile utilità pratica, perchè ci permetterà di ottenere rapidamente dei risultati, che, usando gli altri metodi otterremmo solo con grande dispendio di tempo e con difficoltà molto maggiori.

Per esempio, è noto a tutti gli studiosi come, in molti casi di infezione malarica, per lo scarso numero di ematozoi esistenti nel sangue circolante periferico, il reperto microscopico parassitario possa riuscire negativo non ostante lunghe, pazienti e laboriose ricerche eseguite tanto su preparati a fresco che colorati. In tale caso le nozioni acquisite dalle mie ricerche potranno essere di grande giovamento, perchè basterà raccogliere dal malato alcune gocce di sangue, centrifugarle ed andare ad esaminare quei strati del sedimento globulare, nei quali noi sappiamo che in prevalenza si raccolgono le cellule sanguigne, rosse e bianche. parassitifere o pigmentifere. L'esame dei preparati microscopici così allestiti, e che eventualmente potranno anche essere tinti con quei metodi di colorazione che meglio mettono in evidenza i parassiti malarici, equivarrà presso a poco, allo studio complessivo di quelli che si potrebbero eseguire con tutto il sangue raccolto nel tubetto da centrifugazione. Per conseguenza, in siffatti casi, un reperto negativo ci potrà far dubitare con maggior fondamento che quel dato infermo sia affetto da malaria,

mentre, se si tratta di un individuo malarico, riusciremo molto più facilmente e con maggiore rapidità ad accertare la diagnosi e a riscontrare gli emosporidi o i loro prodotti di metamorfosi. D'altra parte è appunto in questi casi di diagnosi difficile e dubbia che ci sarà necessario di ricorrere alla sierodiagnosi (per il bacillo del tifo, per il *micrococcus melitensis*, ecc.) e per tale ricerca avremo già pronta una notevole quantità di siero, senza che vi sia bisogno di prelevare dell'altro sangue al malato, cosa che d'altronde, per varie circostanze, non sempre è possibile. E come in questa, anche in altre occasioni, come per esempio per scopi didattici, per scopi comparativi, ecc., la centrifugazione del sangue dei malarici potrà recarci vantaggio.

A questo proposito credo opportuno far notare che, nell'eseguire queste mie ricerche io ho potuto constatare che non solo dopo qualche ora, ma anche dopo alcuni giorni dalla prelevazione del sangue dall'infermo, era possibile sia l'esame a fresco sia l'allestimento di preparati microscopici colorati, perchè i globuli sanguigni, rossi e bianchi, si conservano pressochè inalterati, nella forma e nella colorabilità, per un tempo lunghissimo. E' vero, che, come è stato già dimostrato dal Rosembach e dal Sackaroff (6) e come anche io ho potuto verificare nelle mie esperienze, i parassiti della malaria si separano dai globuli rossi dopo un tempo variabile, a seconda della specie diversa di ematozoi, ma in ogni modo, anche in tali condizioni, nel caso di parassiti adulti pigmentati o di semilune, ovvero di leucociti contenenti melanina, sarà sempre facile constatarne la presenza anche dopo parecchi giorni, un mese e perfino dopo tre mesi dalla raccolta del sangue. Io credo poi che il metodo da me indicato potrà con grande probabilità esserci di valido aiuto anche per permetterci di dilucidare e forse per farci risolvere alcuni problemi riguardanti l'epidemiologia della malaria.

Fra questi, per esempio, uno dei più controversi ed importanti è quello che riguarda il modo col quale si ricollegano fra loro le epidemie annuali di malaria estiva. Non ostante le ricerche numerose ed accurate eseguite a tale scopo, il nesso fra un'epidemia di febbri estivo-autunnali e la successiva è quasi completamente sconosciuto, perchè la massima parte degli osservatori (Bastianelli e Bignami, Gosio, Celli, Jezzi, Bettinetti, Ross, Annet e Austen, van de Scheer e van Berckom, Dionisi, Soliani, Mariotti-Bianchi) (7) sono concordi nell'ammettere che nel mese di giugno si rinvenivano solo eccezionalmente nel sangue circolante dei malati i gameti delle febbri estivo-autunnali: perciò non è facile spiegare la prevalenza di queste sulle terzane comuni e sulle quartane durante il mese di luglio, nel quale si inizia l'endemia malarica grave. Soltanto alcuni (Martirano, Boichichio) (8), nel mezzogiorno d'Italia, poterono osservare numerose semilune nel sangue, proprio nel tempo acconcio all'infezione delle zanzare, in modo che le infezioni nuove apparivano evidentemente connesse per qualità e numero con le infezioni recidive.

Ora, siccome il metodo di esame del sangue da me consigliato, ci permette non solo di raccoglierne una quantità molto maggiore di quella che si ottiene con il metodo dei preparati per strisciamento, ma di riscontrarvi anche tutte o quasi tutte le semilune che eventualmente vi si possono trovare, raccolte nella zona del

sedimento globulare più vicina al siero, io credo che lo studio del sangue, praticato con tale metodo, nel periodo interepidemico, negli individui che nella stagione estiva o nella autunnale hanno sofferto di malaria estiva, potrà più facilmente farci constatare la presenza delle semilune, anche nel caso che esse siano scarsissime nel sangue circolante periferico, qualora i gameti delle febbri estivo-autunnali siano veramente l'anello di congiunzione fra l'epidemia passata e la nuova.

Ho detto precedentemente che, nell'eseguire queste mie ricerche, ho praticato l'esame del sedimento del sangue centrifugato, dopo alcuni giorni e perfino 1-3 mesi dopo la prelevazione di esso dal malato. Ciò mi ha fornito l'opportunità di constatare un fatto che a me sembra degno di nota, perchè credo possa servire per risolvere, in modo definitivo ed indiscutibile, una questione ancora controversa. Intendo alludere al movimento che si osserva nei granuli di pigmento melanico, racchiusi nell'interno dei parassiti malarici in alcuni stadi del loro sviluppo.

E' noto che, se si esamina al microscopio un preparato a fresco di sangue malarico, il pigmento suddetto può presentare due specie di movimenti distinti. Uno di questi è dovuto, come tutti ammettono concordemente, ai movimenti ameboidei o a quelli di contrazione e di espansione dei parassiti; il pigmento cioè segue i cambiamenti di forma dell'ematozoo. L'altro movimento, sempre vivacissimo in confronto del precedente, ma più o meno vivace a seconda della varietà del parassita, è stato paragonato dal Laveran a quello dell'acqua in ebollizione, e da altri a quello di uno sciame di mosche, ma sulla sua natura e sulla sua origine esiste ancora discussione fra gli autori. Alcuni, e sono la maggioranza ritengono che si tratti di un semplice movimento browniano, altri lo negano. Il Mannaberg, per esempio, lo considera come prodotto da un movimento a corrente del protoplasma, che viene favorito o impedito da diverse circostanze.

A questo proposito è stato già fatto notare da altri che il movimento del pigmento ha una durata più lunga di quello ameboideo dei parassiti, e d'altra parte il Ziemann (9) ha potuto rilevare che quello persiste anche quando si esamina a fresco il sangue prelevato dal cadavere di un individuo malarico.

Tuttavia queste constatazioni non erano sufficienti per risolvere in modo certo la controversia, perchè si poteva sempre obiettare che in questi casi i parassiti fossero ancora viventi. Io invece ho potuto osservare ripetutamente e far controllare la mia osservazione da altri colleghi, il movimento del pigmento e vivacissimo, in preparati a fresco allestiti dal sedimento del sangue centrifugato, estratto parecchi giorni prima dal torrente circolatorio del malato. Ora non vi può essere dubbio che, in tali circostanze, il parassita malarico dovesse certamente essere morto, o che, per lo meno, le sue manifestazioni vitali dovesero essere molto indebolite, e mi sembra quindi che si possa con ragione concludere definitivamente che il movimento in questione debba considerarsi come di natura browniana e che non si possa accettare l'opinione di coloro che lo ritengono di origine vitale.

La differenza di peso specifico fra i globuli rossi parassitiferi e quelli bianchi

pigmentiferi da un lato e gli eritrociti e i leucociti normali dall'altro, messa in rilievo da queste mie ricerche, deve certamente avere anche essa una grande importanza nel determinare quella varia distribuzione, nei diversi distretti del sistema vasale dei malarici, che è stata già constatata dai clinici e dagli anatomo-patologi, dei primi fra questi elementi cellulari ora ricordati. Ma non credo che i risultati che io ho ottenuto sul sangue malarico estratto dal torrente circolatorio e centrifugato si possano riportare, senz'altro, all'uomo malato e che si possa, fondandosi sopra questi soli dati, stabilire *a priori* quale debba essere il reperto che si dovrà riscontrare nei diversi distretti vascolari dei vari organi degli individui malarici.

Molti altri fattori, di diversa natura ed origine, alcuni dei quali già noti, altri forse ancora sconosciuti, debbono contribuire a provocare questa differente ripartizione, e non si può escludere che alcuni di tali fattori possano agire in senso contrario a quello dovuto al peso specifico differente e che in alcune circostanze speciali essi possano giungere fino a neutralizzare del tutto l'azione di quest'ultima causa.

Il Biernacki (10) ha già fatto osservare che la sedimentazione del sangue non si può considerare come una semplice sedimentazione meccanica dei corpuscoli sanguigni sospesi nel plasma e che gli eritrociti, nel sangue circolante, contengono, nel loro interno una certa quantità di plasma, che essi perdono quando sedimentano. E il Bignami, d'altra parte, ha fatto notare, come ho già riferito in principio, la importanza che, a questo proposito, hanno quelle alterazioni delle altre proprietà fisiche dei globuli parassitiferi, da lui messe in rilievo.

Tuttavia, se noi cerchiamo di mettere in rapporto i dati risultanti da queste mie ricerche con i reperti clinici e con quelli anatomo-patologici degli organi dei malarici, già conosciuti, vediamo che essi non sono in contrasto fra loro, ma che anzi questi ultimi si possono benissimo spiegare anche con quelle differenze di peso specifico fra gli elementi cellulari del sangue, parassitiferi o no, da me indicate.

Così, per esempio, è molto probabile che la nota proprietà che hanno le emazie contenenti parassiti, specialmente adulti, di essere meno adatte alla circolazione e di essere, in un preparato a fresco di sangue, meno facilmente spostabili che le emazie normali, sia dovuta, oltre che alla diminuita elasticità del discoplasma ed alla maggiore viscosità della superficie, come ritiene il Bignami, anche all'aumento del peso specifico di tali globuli. E a quest'ultima ragione, oltre che alle altre, si deve attribuire anche il ristagno e l'accumularsi dei globuli rossi, contenenti parassiti adulti o in sporulazione, nelle reti capillari di alcuni organi, specialmente nel cervello, nelle quali gli eritrociti amebiferi sono così stipati che spesso non vi si trovano che scarse emazie normali. In questi territori capillari, a causa del lume piccolissimo, le resistenze circolatorie sono grandi e le alterazioni degenerative degli endoteli vasali, secondarie al difetto di circolazione, divengono ragione nuova di stasi, cosichè la corrente sanguigna, diventata troppo debole e lenta non è più capace nè sufficiente per spostare degli elementi cellulari diventati invece più vischiosi meno elastici e più pesanti degli altri.

E, sempre in accordo con i dati forniti da queste mie ricerche, si può spiegare il reperto più volte controllato dagli anatomo-patologi che, in quelli stessi vasi cerebrali, nei quali si ha quell'enorme invasione e ristagno di emazie parassitifere, al quale abbiamo or ora accennato, solo eccezionalmente si trovano invece degli accumuli di leucociti melaniferi (trombosi fagocitarie).

Infatti, in questi distretti vascolari, non ostante il rallentamento circolatorio ed il lume piccolissimo, i globuli bianchi con pigmento possono circolare più facilmente delle emazie contenenti parassiti, perchè più leggere di queste.

BIBLIOGRAFIA.

1. MARCHIAFAVA e BIGNAMI. *L'infezione malarica*.
2. CELLI A. *La malaria secondo le nuove ricerche*. 2^a edizione. Roma, Società editrice Dante Alighieri, pag. 44.
3. BORDET J. et O. GENGOU. *Recherches sur la coagulation du sang*. Annales de l'Institut Pasteur, 1903, vol. XVII, pag. 822.
4. IUDSON DALAND. *Ueber das Volum der rothen und weissen Blutkörperchen*. Fortschritte der Medicin, 1891, num. 21.
5. MARCANO G. *La sédimentation sanguine et l'hémostéréométrie*. Journal de physiologie et de pathologie générale, 1901, pag. 167.
6. ROSEMBACH O. *Die Conservirung lebender Malariaparasiten*. Berliner klinische Wochenschrift, 1891, num. 34.
- SAKHAROFF. *Ueber aseptische Protozoenculturen*. Centralblatt für Bakteriologie, 1894, Bd. XV, num. 5-6.
7. BASTIANELLI G. e BIGNAMI A. *La malaria e le zanzare*. Roma, Congresso di medicina interna, 1899.
- GOSIO B. *La malaria di Grosseto nel 1899*. Policlinico, 1900, vol. II, M.
- CELLI A. *La epidemiologia della malaria secondo le recenti vedute biologiche*. Atti della Società italiana per gli studi della malaria. Vol. II, 1901.
- FEZZI. *La malaria nel Cremasco*. Atti della Società ital. per gli studi della malaria. Vol. II.
- BETTINETTI. *La malaria a Milano e nei dintorni*. Atti della Società italiana per gli studi della malaria. Vol. II.
- ROSS, ANNET e AUSTEN. *Report of the Malaria expedition of the Liverpool School of tropical Medicine and Medical Parasitology, tropical Medicine*. The Thompson Iafes Laboratories Report. Vol. II. Reprints a. Reports 1899.
- Van der SCHEER e van BERLEKOM. *Malaria and Mosquitos in Zealand*. British Medical Journal, 1901. Saturday. Jan. 26.
- DIONISI A. *La malaria di Maccarese dal marzo 1899 al febbraio 1900*. Annali di Igiene Sperimentale, 1901. Vol. XI (nuova serie), pag. 453.
- SOLIANI. *La malaria in provincia di Mantova*. Atti della Società italiana per gli studi della malaria, 1902. Vol. III.
- MARIOTTI-BIANCHI G. B. *Sulla malaria nella guarnigione di Roma dal gennaio al luglio 1902 e sui rapporti della malaria regidivale collo scoppio della nuova epidemia*. Riforma Medica, 1903. Anno XIX, num. 12, pag. 313.
8. MARTIRANO. *La malaria nel mezzogiorno d'Italia*. Atti della Società italiana per gli studi della malaria, 1901, vol. II, e 1902, vol. III.
- BOCHICCHIO. *La malaria nel Molfese (Basilicata) nel 1902*. Atti della Società italiana per gli studi della malaria, 1902, vol. III.
9. ZIEMANN HANS. *Malaria*. Handbuch der Tropenkrankheiten. 1906.
10. BIERNACKI E. *Weitere Beobachtungen über die spontane Blutsedimentirung*. Zeitschrift für physiologische Chemie, 1897, vol. XXIII, pag. 368.

IL POLICLINICO

PERIODICO DI MEDICINA, CHIRURGIA E IGIENE

DIRETTO DAI PROFESSORI

GUIDO BACCELLI | FRANCESCO DURANTE

DIRETTORE DELLA R. CLINICA MEDICA
DI ROMA

DIRETTORE DEL R. ISTITUTO CHIRURGICO
DI ROMA

con la collaborazione di altri Clinici, Professori e Dottori Italiani e stranieri

si pubblica in tre Sezioni distinte:

Medica — Chirurgica — Pratica

IL POLICLINICO
chirurgica e dell'igiene.

nella sua parte originale (Archivii) pubblica i lavori dei più distinti clinici e cultori delle scienze mediche, riccamente illustrati, sicchè i lettori vi troveranno il riflesso di tutta l'attività italiana nel campo della medicina, della

SEZIONE PRATICA

che per sè stessa costituisce un periodico completo, contiene lavori originali d'indole pratica, note di medicina scientifica, note preventive e tiene i lettori al corrente di tutto il stato delle scienze suddette, occupandosi soprattutto di ciò che riguarda la pratica. Tali riviste sono fatte da valenti specialisti.

ma sufficienti relazioni delle sedute di Accademie, Società e Congressi, e di quanto si viene operando nei principali centri scientifici, speciali corrispondenze.

Non trascura di tenere informati i lettori delle scoperte ed applicazioni nuove, dei rimedi nuovi e nuovi metodi di cura, dei nuovi strumenti, ecc. ecc. Contiene anche un ricettario con le migliori e più recenti formole.

Pubblica articoli e quadri statistici intorno alla mortalità e alle malattie contagiose nelle principali città d'Italia, e dà notizie esatte sulle condizioni e sull'andamento dei principali ospedali.

Pubblica le disposizioni sanitarie emanate dal Ministero dell'Interno, potendo esserne informato immediatamente, e una scelta e accurata Giurisprudenza riguardante l'esercizio professionale.

Pubblica in una parte speciale tutte le notizie che possono interessare il ceto medico: Promozioni, Nomine, Concorsi, Esami, Condotte vacanti, ecc.

Tiene corrispondenza con tutti quegli abbonati che si rivolgeranno al *Policlinico* per questioni d'interesse scientifico, pratico e professionale.

A questo scopo dedica una rubrica speciale e fornisce tutte quelle informazioni e notizie che gli verranno richieste.

IL POLICLINICO contiene ogni volta accurate recensioni bibliografiche, e un indice di bibliografia medica, col titolo dei libri editi recentemente in Italia e fuori, e delle monografie contenute nei Bollettini delle Accademie e nei più accreditati periodici italiani ed esteri.

A questo proposito si invitano gli autori a mandare copia delle opere e delle monografie da loro pubblicate.

LE TRE SEZIONI DEL POLICLINICO adunque, per gl'importanti lavori originali, per le copiose e svariate riviste, per le numerose rubriche d'interesse pratico e professionale, sono i giornali di medicina e chirurgia i più completi possibili e che meglio rispondono alle esigenze dei tempi moderni.

ABBONAMENTI ANNUI:

	Italia	Unione postale
1. Alla sezione medica e alla sezione pratica . . .	L. 15	20
2. Alla sezione chirurgica e alla sezione pratica »	15	20
3. Alle tre sezioni insieme	20	27
4. Alla sola sezione pratica	10	12.50

Un num. separato della sezione medica o chirurgica Lire UNA

Un num. separato della sezione pratica cent. 50.



Gli abbonamenti cominciano a decorrere dal primo di gennaio di ogni anno.

Il *Policlinico* si pubblica sei volte il mese.

La **sezione medica** e la **sezione chirurgica** si pubblicano ciascuna in fascicoli illustrati di 48 pagine, che in fine di anno formeranno due distinti volumi.

La **sezione pratica** si pubblica una volta la settimana in fascicoli di 32 pagine.